

ANÁLISE DE DADOS CLÍNICOS, IMUNO-HISTOQUÍMICOS E CIRÚRGICOS DE INDIVÍDUOS COM ADENOMAS HIPOFISÁRIOS CLASSIFICADOS SEGUNDO CRITÉRIOS DE 2017 DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE E COM DIFERENTES GRAUS DE INVASÃO DO SEIO CAVERNOSO

Palavras-Chave: Adenoma de hipófise; agressividade tumoral; imuno-histoquímica

Autores(as):

Eduardo Hadad Cherulli / FCM – PUC CAMPINAS

Prof. Dr. Fábio Rogério (Orientador), Dep. Patologia / FCM – UNICAMP

Coautores(as):

Bruna da Silva Nascimento / FCM – UNICAMP

Arethusa de Souza, Dep. Patologia / FCM – UNICAMP

Katariny Parreira de Oliveira Alves, Dep. Patologia / FCM – UNICAMP

Heraldo Mendes Garmes, Dep. Clínica Médica / FCM – UNICAMP

Mateus Dal Fabbro, Dep. Neurologia / FCM – UNICAMP

INTRODUÇÃO

O adenoma hipofisário (AH) é uma neoplasia originada das células epiteliais glandulares da hipófise, sendo que o AH corresponde a 15% dos tumores intracranianos e é mais frequente em mulheres de 30 a 60 anos, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) [1]. Os AHs podem ser classificados de diferentes formas, com base em dados de neuroimagem, clínicos, laboratoriais e histológicos.

Dentre as classificações de AHs, considerando-se imagens de ressonância magnética de crânio (RMC), as lesões são classificadas de acordo com o seu tamanho. Uma das classificações baseia-se na apresentação clínica do AH, ou seja, funcionante ou não-funcionante. Na forma não-funcionante, as células tumorais não secretam hormônios ou os hormônios secretados não determinam manifestação clínica. Já na forma funcionante, as células neoplásicas secretam hormônios que determinam um quadro clínico conforme o tipo de hormônio produzido. Ademais, os hormônios produzidos pela neoplasia são os mesmos secretados pelas células normais. Neste sentido, também é possível classificar os AHs de acordo com o tipo de hormônio liberado em excesso.

Em 2017, a OMS atualizou os critérios de classificação dos AHs, adicionando a informação sobre a linhagem celular do tumor como um guia para sua categorização [2,12]. Desse modo, os fatores de transcrição responsáveis pela diferenciação e maturação das linhagens das células neuroendócrinas da bolsa de Rathke assumiram uma posição relevante para o diagnóstico dos AHs [2]. Os principais são: fator de transcrição pituitário - específico positivo (PIT-1), o qual participa da diferenciação das linhagens somatotrófica, lactotrófica e tireotrófica; fator de transcrição da família T-box (T-PIT), associado com a diferenciação corticotrófica; e o fator esteroideogênico 1 (SF-1) que se relaciona com a diferenciação gonadotrófica [2]. Assim, atualmente, a classificação do tipo de AH se baseia no hormônio sintetizado pelo tumor e na expressão do fator de transcrição da linhagem celular neoplásica [2,12]. Dessa forma, as lesões podem ser classificadas do ponto de vista morfofuncional como adenomas somatotróficos, lactotróficos, tireotróficos, corticotróficos e gonadotróficos [3].

Os AHs podem apresentar sinais e sintomas clínicos em função do crescimento tumoral, bem como secundários a hiper ou hiposecreção hormonal [4]. As manifestações hormonais mais comuns são: síndrome de Cushing (excesso de secreção de ACTH), acromegalia (hipersecreção de GH) e hiperprolactinemia (secreção excessiva do hormônio prolactina), sendo que 53% dos adenomas são produtores de prolactina, 12% de GH e 4% de ACTH. Além disso, 30% dos tumores são não funcionantes, ou seja, seus portadores não apresentam manifestação clínica associada ao hormônio produzido pelo tumor. Particularmente, a maioria dos AHs não-funcionantes sintetizam FSH e/ou LH [11,12].

Concomitantemente ao crescimento do AH, poderá haver invasão do seio cavernoso e expansão pela sela túrcica. Neste contexto, o grau de crescimento e de invasão tumoral podem ser determinados por meio da RMC e tomando-se por base as classificações de Knosp e de Hardy [6,19]. Além disso, o tumor pode ser classificado conforme o comprometimento de estruturas

adjacentes, a saber: dura-máter, seios paranasais, seios cavernosos e artéria carótida interna. Tal comprometimento refletiria a capacidade invasiva da lesão e pode ser graduado também por meio das escalas mencionadas acima [16,17]. Particularmente, os maiores graus na classificação de Knosp (grau 3 ou 4) estariam associados a maior agressividade tumoral, refletindo em mais dificuldade para ressecção cirúrgica completa. Assim, um maior grau nesta classificação implicaria maior chance de ocorrência de lesão residual, e consequentemente, favoreceria a recidiva neoplásica [5,6,7,10].

Já a classificação de Hardy avalia a invasão tumoral selar e supraselar (Quadro 3). Especificamente, tumores invasivos na classificação de Hardy são considerados como grau III ou IV. Por sua vez, as extensões supraselar e parasselar não são consideradas sinais radiológicos de invasão [6,19].

Outro parâmetro usado para inferir a agressividade tumoral é a avaliação da imunomarcagem para a proteína p53. Tal proteína é um marcador tecidual associado à proliferação celular, cuja validade para indicar agressividade em AH tem sido discutida [20]. Especificamente, a proteína p53 tem papel de supressão de crescimento tumoral, sendo que, em condições adversas, é ativada e interrompe o ciclo celular [21, 22, 23]. Por outro lado, mutações no gene que codifica a proteína p53 determinam perda de função, diminuição de seu *turnover* e acúmulo intranuclear [21,22]. Tal acúmulo pode ser detectado por meio de técnica imuno-histoquímica. Trouillas et al propuseram relevância prognóstica para a proteína p53, quando o número de núcleos fortemente positivos é maior que dez / 10 CGA [15, 20, 24]. No entanto, a importância da proteína p53 para indicar agressividade tumoral ainda é debatida no caso dos AHs, uma vez que sua detecção tem sido apresentada na literatura de forma subjetiva e, portanto, de difícil reprodutibilidade [12,25,26].

A proteína Ki-67 também é um marcador de proliferação celular, sendo que alguns autores verificaram imunopositividade para esta proteína maior que 3% de núcleos em lesões mais agressivas [8,9,21]. Por outro lado, a relação entre o percentual de células positivas para Ki-67 e maior recidiva neoplásica ainda é controversa como fator prognóstico. De fato, maior número de figuras de mitoses, parece corresponder a adenomas mais agressivos [13,14,15]. Segundo Trouillas et al, duas figuras de mitose em 10 campos de grande aumento (CGA) pode ser considerado um valor elevado [15,20,24]. Além disso, há indícios de que existe uma correlação entre tumores mais agressivos (de maior grau na classificação de Knosp) com a maior frequência de núcleos positivos para Ki-67, bem como com o maior número de figuras de mitose [8,9].

O tratamento para o AH pode ser clínico, cirúrgico e/ou radioterápico. Especificamente, o AH produtor de prolactina geralmente é tratado de forma clínica, através do uso de cabergolina ou bromocriptina (ambos agonistas de dopamina). Já os adenomas secretores de GH ou de ACTH, de forma geral, são abordados por meio da ressecção cirúrgica e do uso medicamentosos. No caso do tumor secretor de GH podem ser usados análogos de somatostatina, agonistas dopaminérgicos e pegvisomanto, um antagonista do receptor de GH, sendo que, no tumor secretor de ACTH, podem ser utilizados um bloqueador de síntese de cortisol como o cetoconazol, a mifepristona, um antagonista da ação do cortisol, o pasireotide, análogo da somatostatina de segunda geração e agonistas dopaminérgicos para o controle tumoral. No caso do AH clinicamente não funcionante, é mais comum optar-se pela abordagem cirúrgica endoscópica, pois tal procedimento aumenta as chances de ressecção total do tumor e de preservação do campo visual [26]. Por sua vez, a radioterapia é usada para lesões cuja ressecção foi parcial, indivíduos com contraindicações para cirurgia ou após outras abordagens sem sucesso [18].

Assim, no presente estudo, serão investigadas eventuais associações entre achados macroscópicos de neuroimagem, microscópicos e de imunomarcagem em AHs tratados em centro de referência brasileiro e classificados conforme os critérios propostos pela OMS em 2017. A escassez de dados na literatura nacional e internacional sobre AHs classificados em função de tais critérios, bem como sobre as associações patológicas, radiológicas e clínicas que serão investigadas, justificam o presente estudo. Especificamente, serão considerados (i) os graus conforme as classificações de Knosp e Hardy e (ii) os seguintes achados histológicos sugestivos de agressividade: contagem de figuras mitóticas, bem como percentual de núcleos imunomarcados para p53 e Ki-67. A hipótese é de que AHs com maiores graus nas classificações de Knosp e Hardy apresentem características microscópicas que sugiram comportamento local mais agressivo e apresentem pior prognóstico.

METODOLOGIA

Foram estudados 27 indivíduos (n=27) divididos em dois grupos: (i) controle, composto por 6 indivíduos (n=6) e (ii) casos de adenomas hipofisários, composto por 21 indivíduos (n=21). Como controle, foram utilizadas amostras da hipófise de indivíduos adultos submetidos a necropsia no HC/Unicamp e sem histórico de AHs. O material dos AHs foi obtido a partir de casos de indivíduos tratados no HC/Unicamp, tendo sido submetidos à cirurgia e ressecção do material tumoral. Os cortes histológicos obtidos foram corados pelas técnicas de hematoxilina e eosina (HE), tricrômico de Masson (TM) e reticulina.

Em relação ao grupo de AHs, foram avaliados os prontuários médicos de pacientes de ambos os sexos com esse diagnóstico que foram operados no HC/Unicamp no período de janeiro de 2012 a março de 2022. Foram tabelados os dados clínicos (sexo, idade ao ser realizada a abordagem operatória), classificações de Knosp e Hardy, em função dos dados radiológicos, e achados histopatológicos (incluindo as classificações da OMS de 2017 e 2021). A partir disso, foram separados

espécimes representativos de material dos pacientes selecionados sendo realizada a identificação dos tipos de AH por meio de imunomarcção.

Na etapa seguinte, essas lâminas foram escaneadas e digitalizadas manualmente pelo uso do software ImageJ® para realizar a captura de imagens representativas de 10 campos histológicos aleatórios nas lâminas digitais.

Assim, iniciou-se a análise qualitativa da positividade nuclear para proteína p53, onde, com o uso do programa ImageJR foi feito o processamento dos 10 campos selecionados por meio do plugin IHC Profiler, que gera um contraste binário (Thresholding), em preto e branco, onde o operador define visualmente o ponto de corte na escala de cinza que mantenha a marcação nuclear mais fidedigna possível a das imagens coloridas (características da marcação, ou seja, intensidade e contraste com o fundo). Assim, é calculado o quociente de imunomarcção, *pixels* positivos em relação ao total de *pixels* na imagem, que contempla a distribuição de positividade na área amostrada em porcentagem.

A análise da reação imuno-histoquímica de Ki-67 foi feita de maneira quantitativa, pela contagem de estruturas marcadas, núcleos positivos para Ki-67, em 10 campos de grande aumento (objetiva de 40x), com a utilização do programa ImageJ®. Dessa forma, foi computada manualmente a quantidade precisa de núcleos positivos em relação ao total de núcleos, gerando uma porcentagem de núcleos positivos.

Os dados obtidos da etapa anterior foram tabelados e processados por meio de análise estatística. As variáveis categóricas, como os dados clínicos, foram submetidas a uma análise descritiva com apresentação em tabelas de frequências, enquanto as variáveis contínuas foram analisadas segundo medidas de posição (como média e mediana) e dispersão. Para comparação de medidas contínuas entre 2 grupos, foi aplicado o teste de Mann-Whitney e, para 3 grupos, o teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%.

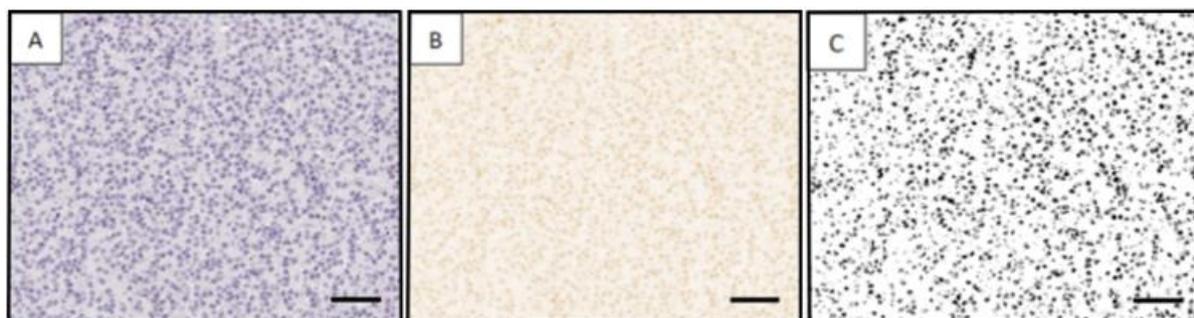


Figura 1. Avaliação semiquantitativa de imunomarcção em corte histológico de adenoma de hipófise por meio do programa ImageJ®. As imagens apresentadas em A, B e C são do mesmo campo histológico e correspondem, respectivamente, à imunomarcção por peroxidase/diaminobenzidina contracorada com hematoxilina, deconvolução do canal para diaminobenzidina e processamento para aumento de contraste binário (thresholding). Em C, notar que as estruturas/regiões evidenciadas em preto mantêm as características da marcação e distribuição observadas nos campos A e B (onde a positividade aparece sob a forma de precipitado marrom). Detalhes da utilização do programa e interpretação dos dados são apresentados no texto. Barra de escala: 50 μ m (A – C).

RESULTADOS

Na presente casuística, a maioria dos indivíduos foi constituída por homens (63% dos pacientes). Ainda, com relação aos dados clínicos, a média de idade em que os indivíduos foram submetidos a procedimento cirúrgico para ressecção dos AHs foi de 49.8 ± 14.4 anos (média \pm desvio-padrão).

Com relação às análises imuno-histoquímicas para avaliar os marcadores de atividade proliferativa celular, verificou-se diferença entre os grupos controle e AH com relação ao percentual de área positiva para p53. Especificamente, foi observado valor médio maior no grupo AH (0.148 ± 0.044 ; média \pm desvio-padrão) em relação ao controle (0.086 ± 0.020 ; $p=0.0022$). No entanto, ao se avaliar o percentual médio de núcleos marcados para Ki-67, não foi observada diferença estatística entre os grupos.

Ainda, considerando os pacientes como portadores de AH com diferentes graus de invasão tumoral (alto e baixo grau) segundo as classificações de Knosp e Hardy, foram investigadas eventuais diferenças com relação à expressão dos marcadores de atividade proliferativa celular. Especificamente, ao se considerar o percentual de área positiva para p53 em tumores classificados pela escala de Knosp, não foi observada diferença significativa entre as lesões de baixo e alto grau ($p=0.3787$). O mesmo foi verificado com relação aos graus de invasão na classificação de Knosp e o percentual médio de núcleos imunopositivos para Ki-67 (0.5034).

Ao se considerar os graus de invasão segundo a classificação de Hardy, também não foi observada diferença entre os grupos de baixo e alto grau quando foi avaliado o percentual de área positiva para p53 ($p=1.0000$) e o percentual médio de núcleos marcados para Ki-67 ($p=0.2476$).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A presente casuística foi constituída predominantemente por homens (63%). Este achado diverge de relatos e séries prévios da literatura, segundo os quais os AHs predominam em mulheres. Uma possível explicação para tal divergência seria que a maior parte dos AHs é do tipo lactotrófico, os quais têm como primeira escolha de tratamento a abordagem farmacológica (e não cirúrgica). Como o material utilizado para a análise histológica do presente estudo é proveniente de espécimes obtidos em procedimentos cirúrgicos, os casos com tratamentos diferentes desta abordagem não integram a casuística aqui apresentada.

Ainda, a média de idade dos indivíduos com AHs no presente estudo foi de 49,8 anos. Essa média pode ser considerada elevada em relação a outras pesquisas feitas previamente sobre a epidemiologia dos AHs, as quais mostraram que a maioria desses tumores são diagnosticados mais precocemente em mulheres jovens do que em homens, devido à alta prevalência de AHs lactotróficos (antes chamado de prolactinoma) em indivíduos do sexo feminino em idade fértil [27].

Em relação aos estudos imuno-histoquímicos para avaliação de atividade proliferativa celular por meio do marcador Ki-67, a literatura demonstra dados controversos. De fato, há sobreposição considerável, com relação ao percentual de núcleos imunomarcados para Ki-67, entre adenomas não invasivos e invasivos, bem como entre adenomas e carcinomas hipofisários. Além disso, não há relação direta entre o índice de marcação de Ki-67 e invasividade tumoral, tamanho do tumor hipofisário, fração de crescimento e recorrência. Ainda, vários estudos encontraram associações conclusivas de índices de marcação de Ki-67 com comportamento agressivo, tamanho e/ou subtipo de AH, ao passo que outras investigações não obtiveram as conclusões semelhantes [28]. Neste contexto, estudos retrospectivos como o de Glebauciene et al. [29] evidenciou associação direta entre a expressão de Ki-67 e a invasão de AHs. Por outro lado, a mesma associação não foi verificada com relação às escalas de Knosp e Hardy. Já Burman P et al. [32] reportaram relação direta entre o marcador p53 e o Ki-67, em que expressão de p53 \geq 10% células foi associada a índices de Ki67 mais altos em comparação com expressão de p53 em menos de 10% das células. É possível que métodos diferentes para avaliação da expressão tecidual de p53 e Ki-67, incluindo a consideração da positividade do primeiro, tenham contribuído com a discrepância de conclusões sobre o caráter preditivo de prognóstico destes marcadores.

Especificamente, o marcador p53 tem valor prognóstico inconclusivo quando considerado de forma isolada. No estudo de Thapar et al. a imunoreatividade de p53 está correlacionada com a invasão do tumor, sendo positiva em 15% dos adenomas invasivos e em todos os carcinomas hipofisários, mas está ausente em adenomas não invasivos. Desta forma, tais autores consideraram o p53 como um indicador de agressividade em AHs [30]. Entretanto, outros pesquisadores observam que ainda faltam valores de corte específicos para se considerar imunopositividade para p53, assim como critérios bem estabelecidos para “índice mitótico elevado” [31]. Desta forma, como mencionado acima, a falta de critérios objetivos para se avaliar parâmetros histológicos pode levar à falta de conclusão sobre a importância da proteína p53 no comportamento biológico/padrão de crescimento (agressivo/invasivo) de AHs.

Por fim, na presente casuística, ao se considerar os dados histológicos de atividade proliferativa celular dos AHs (percentual de área positiva para p53 e percentual médio de núcleos marcados para Ki67), não foi verificada diferença estatística entre os grupos de alto ou baixo grau de invasão local conforme as classificações radiológicas utilizadas. É possível que os valores baixos de média que foram verificados para os dois marcadores no presente estudo não permitam discriminar grupos de comportamento biológicos distintos. De qualquer forma, é importante ressaltar que o método apresentado aqui para avaliação de expressão de p53 é original e objetivo, permitindo que seja usado em outras análises com casuísticas maiores.

Em conclusão, neste trabalho, foram comparadas amostras de hipófise normal e AHs para avaliação de parâmetros histológicos de atividade proliferativa celular (imunexpressão de p53 e de Ki-67). Além disso, buscou-se identificar diferenças entre lesões com baixo ou alto grau de invasão local considerando-se tais parâmetros. Especificamente, os presentes dados apoiam aumento da expressão tecidual de p53 em AHs, em comparação com tecido hipofisário normal. Não foram verificadas diferenças com relação à expressão tecidual de Ki-67 entre AHs e hipófise normal nem com relação à expressão de p53 entre tumores com baixo ou alto grau de invasão local. Ainda que a importância biológica destes achados histológicos esteja em discussão para AHs, o presente trabalho apresenta uma proposta de avaliação digital das imunomarcações para p53 e Ki-67 de forma objetiva e reproduzível, a qual poderá ser empregada em futuros trabalhos que visem investigar outros parâmetros histológicos de AHs e associá-los a dados de evolução e prognóstico.

BIBLIOGRAFIA

1. Lloyd, R. V. (eds) (2017) Who Classification of Tumours of Endocrine Organs. 4th ed. Lyon: IARC.
2. Lopes MBS. The 2017 World Health Organization classification of tumors of the pituitary gland: a summary. *Acta Neuropathol.* 2017 Oct;134(4):521-535. doi: 10.1007/s00401-017-1769-8. Epub 2017 Aug 18. PMID: 28821944.
3. Lake M.G, Krook LS, Cruz SV. Pituitary adenomas: an overview. *Am Fam Physician.* 2013 Sep 1;88(5):319-27. PMID: 24010395.
4. Lake MG, Krook LS, Cruz SV. Pituitary adenomas: an overview. *Am Fam Physician.* 2013 Sep 1;88(5):319-27. PMID: 24010395.
5. Micko AS, Wöhrer A, Wolfsberger S, Knosp E. Invasion of the cavernous sinus space in pituitary adenomas: endoscopic verification and its correlation with an MRI-based classification. *J Neurosurg.* 2015 Apr;122(4):803-11. doi: 10.3171/2014.12.JNS141083. Epub 2015 Feb 6. PMID: 25658782.

6. Rutkowski M, Zada G. Management of Pituitary Adenomas Invading the Cavernous Sinus. *Neurosurg Clin N Am*. 2019 Oct;30(4):445-455. doi: 10.1016/j.nec.2019.05.005. Epub 2019 Jul 16. PMID: 31471051.
7. Dhandapani S, Singh H, Negm HM, Cohen S, Anand VK, Schwartz TH. Cavernous Sinus Invasion in Pituitary Adenomas: Systematic Review and Pooled Data Meta-Analysis of Radiologic Criteria and Comparison of Endoscopic and Microscopic Surgery. *World Neurosurg*. 2016 Dec;96:36-46. doi: 10.1016/j.wneu.2016.08.088. Epub 2016 Aug 30. PMID: 27591098.
8. Glebauskienė B, Liutkeviciene R, Vilkeviciute A, Gudnaviciene I, Rocyte A, Simonaviciute D, Mazetyte R, Kriauciuniene L, Zaliuniene D. Association of Ki-67 Labelling Index and IL-17A with Pituitary Adenoma. *Biomed Res Int*. 2018 May 31;2018:7490585. doi: 10.1155/2018/7490585. PMID: 29955610; PMCID: PMC6000872.
9. Li Yuhan, Wu Zhiquan, Tian Jihui & Pan Renlong (2021): Ki-67 labeling index and Knosp classification of pituitary adenomas, *British Journal of Neurosurgery*, DOI:10.1080/02688697.2021.1884186
10. Bonneville JF, Potorac J, Beckers A. Neuroimaging of aggressive pituitary tumors. *Rev Endocr Metab Disord*. 2020 Jun;21(2):235-242. doi: 10.1007/s11154-020-09557-6. PMID: 32451879.
11. Daly AF, Beckers A. The Epidemiology of Pituitary Adenomas. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2020 Sep;49(3):347-355. doi: 10.1016/j.ecl.2020.04.002. Epub 2020 Jun 10. PMID: 32741475.
12. Mete O, Lopes MB. Overview of the 2017 WHO Classification of Pituitary Tumors. *Endocr Pathol*. 2017 Sep;28(3):228-243. doi: 10.1007/s12022-017-9498-z. PMID: 28766057
13. Miermeister CP, Petersenn S, Buchfelder M, et al. Histological criteria for atypical pituitary adenomas - data from the German pituitary adenoma registry suggests modifications [published correction appears in *Acta Neuropathol Commun*. 2016;4(1):21]. *Acta Neuropathol Commun*. 2015;3:50. Published 2015 Aug 19. doi:10.1186/s40478-015-0229-8
14. Manojlovic-Gacic E, Engström BE, Casar-Borota O. Histopathological classification of non-functioning pituitary neuroendocrine tumors. *Pituitary*. 2018;21(2):119-129. doi:10.1007/s11102-017-0855-1
15. Trouillas J, Roy P, Sturm N, et al. A new prognostic clinicopathological classification of pituitary adenomas: a multicentric case-control study of 410 patients with 8 years post-operative follow-up. *Acta Neuropathol* 126, 123–135 (2013). doi:10.1007/s00401-013-1084-y
16. Knosp, E., Steiner, E., Kitz, K., Matula, C. (1993) Pituitary adenomas with invasion of the cavernous sinus space: a magnetic resonance imaging classification compared with surgical findings. *Neurosurgery*. (4):610-7.
17. Wang, J., Liu, Q., Gao, H., Wan, D., Li, C., Li, Z., et al. (2017) EGFL7 participates in regulating biological behavior of growth hormone-secreting pituitaryadenomas via Notch2/DLL3 signaling pathway. *Tumour Biol*. 9(7):1010428317706203
18. Molitch ME. Diagnosis and Treatment of Pituitary Adenomas: A Review. *JAMA*. 2017 Feb 7;317(5):516-524. doi: 10.1001/jama.2016.19699. PMID: 28170483.
19. Simsek Bagir, Gulay et al. "Knosp and Hardy Grading Systems are Useful in Predicting Persistence of Male Hypogonadism in Prolactinomas Following Prolactin Normalization." (2020). doi:10.25179/tjem.2020-77688
20. Trouillas J, Jaffrain-Rea ML, Vasiljevic A, Raverot G, Roncaroli F, Villa C. How to Classify the Pituitary Neuroendocrine Tumors (PitNET)s in 2020. *Cancers (Basel)*. 2020 Feb 22;12(2):514. doi: 10.3390/cancers12020514. PMID: 32098443; PMCID: PMC7072139.
21. Kanapathipillai M. Treating p53 Mutant Aggregation-Associated Cancer. *Cancers (Basel)*. 2018;10(6):154. Published 2018 May 23. doi:10.3390/cancers10060154
22. Stein Y, Rotter V, Aloni-Grinstein R. Gain-of-Function Mutant p53: All the Roads Lead to Tumorigenesis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(24):6197. Published 2019 Dec 8. doi:10.3390/ijms20246197
23. Sabapathy K, Lane DP. Understanding p53 functions through p53 antibodies [published correction appears in *J Mol Cell Biol*. 2019 Dec 19;11(12):1105]. *J Mol Cell Biol*. 2019;11(4):317-329. doi:10.1093/jmcb/mjz010.
24. Miermeister CP, Petersenn S, Buchfelder M, et al. Histological criteria for atypical pituitary adenomas - data from the German pituitary adenoma registry suggests modifications [published correction appears in *Acta Neuropathol Commun*. 2016;4(1):21]. *Acta Neuropathol Commun*. 2015;3:50. Published 2015 Aug 19. doi:10.1186/s40478-015-0229-8
25. Keskin, F. E., Ozkaya, H. M., Erden, M. B. S., Kadioglu, P., Tanriover, N., Gazioglu, N. (2017) Outcomes of Primary Transsphenoidal Surgery in Cushing Disease: Experience of a Tertiary Center. *World Neurosurg*. 106:374-381.
26. Hayhurst C, Taylor PN, Lansdown AJ, Palaniappan N, Rees DA, Davies JS. Current perspectives on recurrent pituitary adenoma: The role and timing of surgery vs adjuvant treatment. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2020 Feb;92(2):89-97. doi: 10.1111/cen.14127. Epub 2019 Nov 22. PMID: 31715012.
27. Daly AF, Beckers A. The Epidemiology of Pituitary Adenomas. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2020 Sep;49(3):347-355. doi: 10.1016/j.ecl.2020.04.002. Epub 2020 Jun 10. PMID: 32741475
28. Salehi F, Agur A, Scheithauer BW, Kovacs K, Lloyd RV, Cusimano M. Ki-67 em neoplasias hipofisárias: uma revisão - parte I. *Neurocirurgia*. 2009; 65 (3):429–437. doi: 10.1227/01.NEU.0000349930.66434.82.
29. Glebauskienė B., Liutkeviciene R., Vilkeviciute A., Gudnaviciene I., Rocyte A., Simonaviciute D., Mazetyte R., Kriauciuniene L., Zaliuniene D. Associação do índice de marcação de Ki-67 e IL-17A com adenoma hipofisário. *Biomed Res. Int*. 2018; 2018 :7490585. doi: 10.1155/2018/7490585.
30. Das, C. et al. Evaluation of prognostic utility of Ki-67, P53, and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase expression in pituitary tumors. *J Lab Physicians*. 2019; 11(4):323-329. doi: 10.4103/JLP.JLP_76_19.
31. Miermeister, C. P. et al. Histological criteria for atypical pituitary adenomas – data from the German pituitary adenoma registry suggests modifications. *Acta Neuropathol Commun*. 2015; 3:50. doi: 10.1186/s40478-015-0229-8.
32. Burman P, Trouillas J, Losa M, McCormack A, Petersenn S, Popovic V, Theodoropoulou M, Raverot G, Dekkers OM; ESE survey collaborators †. Aggressive pituitary tumours and carcinomas, characteristics and management of 171 patients. *Eur J Endocrinol*. 2022 Sep 19;187(4):593-605. doi: 10.1530/EJE-22-0440. PMID: 36018781; PMCID: PMC9513638.